

LE LIEGE SOUS TOUTES SES COUTURES

LAGORCE Aurélie¹, GEROMETTA Massimiliano^{1,2}, CHANUT Julie¹,
CROUVISIER-URION Kevin³, WINCKLER Pascale^{1,4}, GABRION Xavier²,
THIBAUD Sébastien², GOUGEON Régis D.^{1,5}, BELLAT Jean-Pierre⁶,
KARBOWIAK Thomas¹

¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, L'Institut Agro, Univ. de Bourgogne,
INRAE, UMR PAM 1517, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

² SUPMICROTECH, CNRS, Institut FEMTO-ST, 15B avenue des
Montboucons, 25000 Besançon, France

³ Oniris, Nantes Université, CNRS, GEPEA, UMR 6144, rue de la
Geraudière, CS 82225, 44000 Nantes, France

⁴ Dimacell Imaging Facility, L'Institut Agro Dijon, Univ. Bourgogne
Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

⁵ Univ. Bourgogne Franche-Comté, Institut Agro, Univ. de Bourgogne,
INRAE, UMR PAM 1517, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin – Jules
Guyot, 2 rue Claude Ladrey, 21000 Dijon, France

⁶ Univ. Bourgogne Franche-Comté, ICB UMR 6303 CNRS, 9 Avenue
Alain Savary, B.P. 47870, 21078 Dijon, France

aurelie.lagorce@agrosupdijon.fr

CORK FROM EVERY ANGLE

ABSTRACT

Cork is a natural material that has been used since the Antiquity to seal amphorae and nowadays, it is still the most used material to seal wine bottles. Despite its empirical use, the structure/function relationship of this material is not yet clearly established. A more detailed characterization of cork structure represents therefore a key element in gaining a better understanding of the structure/function relationship. Such approach will also help to predict the behavior of cork during its use as an oenological stopper.

This work presents the latest advances in the characterization of this porous material through a multi-scale investigation. On a mesoscopic scale, X-ray tomography highlighted the macroporosity of cork, named lenticels, and their distribution within a full cork stopper. 3D reconstruction revealed that macropores are not interconnected along the length of a cork stopper. On a microscopic scale, the change between the phellem cells and the lenticels was revealed using two-photon microscopy. Cell differentiation was found to take place on a single layer of cells bordering the lenticel, having a cell wall 10 times thicker than those of the phellem and a different chemical composition. Finally, on a nanoscopic scale, transmission electron microscopy exhibits the structure of the cell wall, with the presence of obstructed plasmodesmata, small channels running through the cork cell wall. Such multi-scale characterization of cork structure has thus provided essential information to better understand the unique mechanical and barrier properties of this natural material.

KEY WORDS

Cork, Electron and two-photon microscopy, Honeycomb structure, Macroporosity, X-ray and neutron tomography.

RESUMÉ

Le liège est un matériau naturel utilisé depuis l'Antiquité pour le bouchage des amphores, qui est aujourd'hui toujours majoritaire sur le marché des obturateurs œnologiques. Malgré son utilisation empirique, la relation structure/fonction de ce matériau n'est toujours pas clairement établie. Une caractérisation plus fine de sa structure constitue ainsi un élément clé pour permettre de mieux appréhender cette relation structure/fonction, et de l'utiliser à terme comme élément permettant de prédire le comportement du liège au cours de son utilisation en tant qu'obturateur œnologique.

Ce travail présente les dernières avancées relatives à la caractérisation de ce matériau par une approche multi-échelle. Tout d'abord, à l'échelle mésoscopique, la tomographie à rayons X a permis de mettre en évidence la macroporosité du liège, constituée de lenticelles, et leur distribution au sein d'un bouchon en liège. Les reconstructions 3D de ces analyses ont révélé que ces macropores n'étaient pas interconnectés sur la longueur du bouchon. A l'échelle microscopique, la frontière entre les cellules du phellème et celles en surface des lenticelles a été mise en évidence par microscopie biphotonique. La différenciation cellulaire au niveau des lenticelles s'opère sur une unique couche de cellules, qui présentent une paroi 10 fois plus épaisse et une composition chimique différente de celles du phellème. Enfin à l'échelle nanométrique, la microscopie électronique à transmission a permis de révéler la structure des parois des cellules, qui présentent à certains endroits des plasmodesmes. Cette caractérisation multi-échelle de la structure du liège a permis de fournir des informations essentielles pour mieux expliquer les propriétés mécaniques et barrière remarquables de ce matériau.

MOTS CLES

Liège, Macroporosité, Microscopie biphotonique, Microscopie électronique à transmission, Structure alvéolaire, Tomographie à rayons X.

1. INTRODUCTION

Le liège est un matériau naturel produit par le chêne liège *Quercus suber L.* Il est issu de la partie externe de son écorce et est constitué de cellules mortes dépourvues de cytoplasme ou d'autres organites contenus habituellement dans les cellules vivantes. Leur structure a été observée pour la première fois au microscope dans les années 1660 par Robert Hooke, qui a donné par la suite le nom de « cellule » à l'unité biologique de tous les êtres vivants [1]. Ce n'est que 300 ans plus tard que Gibson *et al.* [2] se sont intéressés de plus près à cette structure alvéolaire caractéristique et ont ensuite décrit précisément la forme de ces cellules selon les trois axes d'observation du liège : axial, radial et tangentiel.

Le liège présente la particularité d'avoir une porosité constituée de macropores plus ou moins cylindriques, visibles à l'œil nu et de l'ordre de quelques millimètres de diamètre, dénommés lenticelles. Celles-ci permettent de favoriser les échanges gazeux entre l'extérieur et l'intérieur de l'arbre et d'assurer ainsi la survie et le renouvellement des cellules. Après la récolte du liège, tous les 9 ans environ, ces lenticelles constituent l'un des principaux critères visuels d'évaluation de la qualité de ce matériau. Moins elles sont nombreuses en surface, et plus le liège est considéré de qualité élevée. Ce tri visuel du liège, et des bouchons qui en sont issus par tubage selon la direction axiale, demeure très empirique. A ce jour aucun lien n'a été clairement établi dans la littérature entre le nombre de lenticelles, leur taille, leur répartition le long d'un bouchon et les propriétés barrières et/ou mécaniques de ce matériau. Aussi, une connaissance approfondie de la structure de ce matériau s'avère cruciale pour appréhender plus finement les phénomènes de transfert de matière (O_2 , CO_2 , eau...) lors de l'utilisation du liège en œnologie, ainsi que la réponse mécanique du liège lorsqu'il est comprimé dans le goulot d'une bouteille (ce qui entraîne alors une réduction de diamètre de 23%).

Cet article a pour objectif de présenter les dernières avancées relatives à la caractérisation de ce matériau par une approche multi-échelle réalisée au moyen de techniques d'imagerie, permettant chacune d'apporter des éléments complémentaires sur la structure de ce matériau.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Les bouchons en liège

Les bouchons en liège naturel, issus du chêne liège *Quercus suber*, ont été fournis par la société Bouchons Trescases S.A. (France). Les bouchons analysés n'avaient subi ni lavage ni traitement de surface avant analyse et possédaient tous les mêmes caractéristiques dimensionnelles (24 mm de diamètre et 49 mm de longueur). Deux qualités de liège ont été étudiées : un liège de très bonne qualité (grade 0), présentant peu de lenticelles en surface, et un liège de qualité moindre (grade 4), présentant plus de défauts apparents.

2.2. Etude de la structure à l'échelle macroscopique par tomographie à rayons X

Des échantillons de liège ont été soumis à des scans micro-CT *via* le système micro-CT Phoenix Nanotom (General Electric, Heidelberg, Allemagne) qui permettent une reconstruction 3D de l'objet à partir d'une série de mesures par rayons X depuis l'extérieur de cet objet. Le tube à rayons X a été réglé à 45 kV et 445 μ A pour tenir compte de la faible densité du matériau. 2400 images de projection ont été capturées avec un temps d'exposition de 500 ms sur une rotation de 360 degrés avec une résolution de 12 μ m. Le logiciel Octopus Reconstruction 8.9.2 (XRE, Gent, Belgique) a été utilisé pour la reconstruction d'images.

Les objets 3D reconstruits ont ensuite été analysés avec le logiciel Aviso (ThermoFischer Scientific, Bordeaux, France) et un double seuillage a été appliqué pour le calcul de la macroporosité du liège. Le premier seuillage a été appliqué pour isoler la partie creuse des lenticelles (de 1 à 10 sur l'échelle de gris) et un autre pour la matière dense autour de ces dernières (de 130 à 250 sur l'échelle de gris). Le nombre de voxels correspondant à ces deux seuils distincts a ensuite été déterminé afin de calculer le volume occupé par cette macroporosité.

2.3. Etude de la structure cellulaire à l'échelle microscopique

2.3.1. Microscopie électronique à balayage

Les cellules de liège ont été observées par microscopie électronique à balayage (MEB) à l'aide d'un microscope Jeol JSM 7600F (15 kV). Avant observation, les échantillons de liège ont été découpés à l'aide d'une lame de rasoir et recouverts d'une couche de carbone de 15-20 nm d'épaisseur. L'acquisition d'images a été réalisée selon les trois plans du liège afin de tenir compte de l'anisotropie de ce matériau.

2.3.2. Microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique a été utilisée afin d'obtenir une représentation 3D de la structure interne du liège basée sur l'auto-fluorescence de la lignine et de la subérine [3]. Les échantillons de liège ont été au préalable immergés pendant plusieurs mois dans de l'eau distillée à 25 °C, afin d'atteindre une teneur en eau élevée pour améliorer l'acquisition des images. Ces dernières ont été collectées à l'aide d'un microscope à balayage Nikon A1-MP équipé d'un objectif Plan APO IR x60 (NA : 1,27, immersion dans l'eau, Nikon) à une vitesse de balayage de 1 image par seconde. Un laser IR (Chameleon, Coherent) a été utilisé pour fournir une excitation de 800 nm. L'émission d'auto-fluorescence du liège a été recueillie sur quatre canaux de détection : FF01-492/SP (400-492 nm), FF03-525/50 (500-550 nm), FF01-575/25 (563-588 nm) et FF01-629/56 (601-657 nm) (Semrock). La représentation 3D a ensuite été obtenue par superposition d'images scannées sur une épaisseur d'environ 140 µm.

2.4. Etude des parois à l'échelle nanoscopique par microscopie électronique à transmission

Les échantillons de liège ont été congelés sous haute pression dans un congélateur Leica HPM 100. Les échantillons ont été fixés au tétr oxyde d'osmium à 2 % dans de l'acétone à -90 °C pendant 48 heures. La température a été progressivement augmentée à -60 °C pendant 46 h puis à -30 °C pendant 10h avec le même fluide (3 °C.h⁻¹). Les échantillons ont ensuite été rincés avec de l'acétone pur à -30 °C puis infiltrés progressivement avec des mélanges de résine acétone/Epon en augmentant la concentration de résine ainsi que la température jusqu'à 20 °C. La polymérisation a été effectuée à 60 °C. Des

coupes fines de $86 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ d'épaisseur ont été réalisées dans des blocs d'échantillons de liège enrobés dans l'Epon. Elles ont été déposées sur des grilles de cuivre recouvertes de collodion et d'un film carbone. Les coupes ont été colorées avec de l'Uranylless pendant 8 minutes et du citrate de plomb pendant 2 minutes (Electron Microscopy Sciences). Les sections ont été observées avec un microscope électronique à transmission Hitachi H7500 fonctionnant à 80 kV et équipé d'une caméra AMT pilotée par le logiciel AMT (Hitachi).

3. RESULTATS

3.1. Quantification et répartition des lenticelles dans le liège

La quantité de lenticelles en surface représente le principal critère définissant la qualité du liège. Alors que le tri des bouchons en différentes catégories était initialement réalisé à la main par des ouvriers qualifiés, de plus en plus de bouchonniers se sont équipés d'outils de traitement d'image permettant un tri automatique des bouchons. Deux grandes techniques sont utilisées à l'heure actuelle chez les professionnels du secteur : l'imagerie 2D de la surface des bouchons qui permet ainsi de quantifier les lenticelles apparentes ; et la radiographie par rayons X, qui a l'avantage de sonder l'intérieur du matériau et d'avoir ainsi une représentation cumulée des défauts en surface et à l'intérieur du bouchon.

Cependant, ces techniques ne permettent pas de considérer la répartition de cette macroporosité au sein des bouchons en liège. Pour évaluer cette dernière, la tomographie s'avère être la seule technique disponible aujourd'hui. Les tomographies à rayons X réalisées sur des bouchons entiers sont présentées dans la **Figure 1**. Comme attendu, le bouchon de qualité inférieure (grade 4) présente plus de lenticelles que la structure du liège de meilleure qualité (grade 0). Les macroporosités calculées pour ces échantillons s'élèvent à 2 % (v/v) et 6 % (v/v) pour le bouchon grade 0 et grade 4, respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux des travaux de Lagorce-Tachon *et al.*, [4] et Oliveira *et al.*, [5] basées sur la tomographie à neutrons ou à rayons

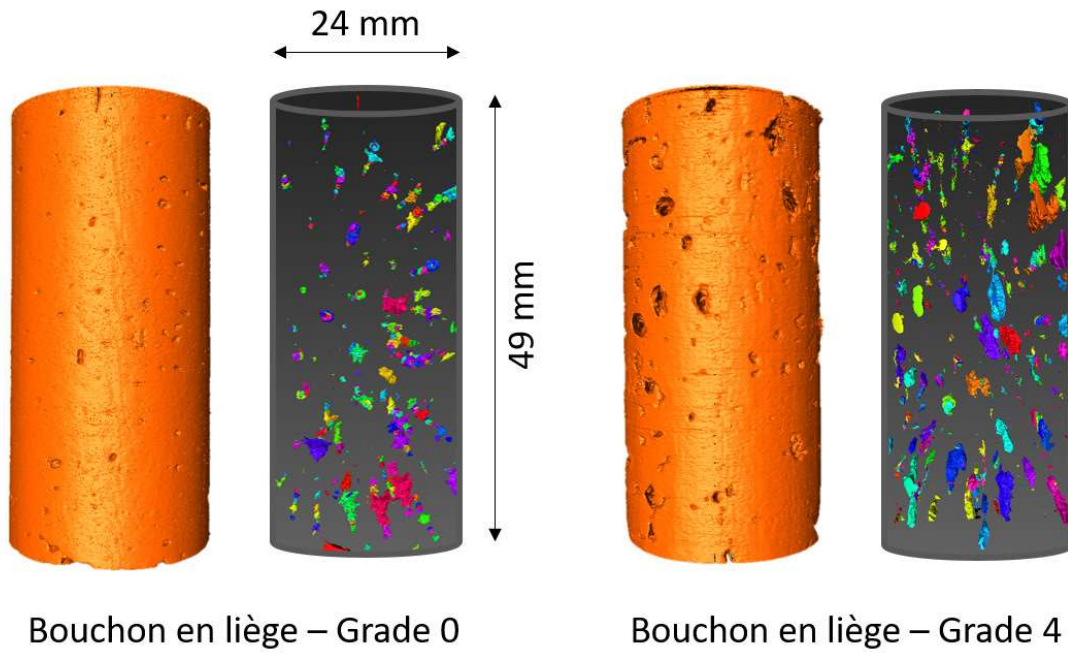


Figure 1 : Tomographie à rayons X de deux bouchons de liège grade 0 (meilleure qualité) et grade 4 (qualité inférieure). Pour chaque échantillon, la surface ainsi que la macroporosité interne (éléments colorés) du bouchon sont représentées (adaptée de Crouvisier-Urien et al., [12]).

X, pour lesquels les volumes poreux calculés allaient de 2 à 5,9 % (v/v) pour les bouchons de haute qualité et de 2,6 à 20,5 % (v/v) pour des bouchons de qualité moindre. Par ailleurs, la répartition de ces lenticelles le long du bouchon a pu être observée et une absence d'interconnectivité a été notée.

3.2. Structure cellulaire et frontière phellème/lenticelle

La structure cellulaire du liège a été observée par microscopie électronique à balayage dans les trois directions du matériau (**Figure 2**). Selon les directions tangentielle et axiale, les cellules de liège présentent une forme parallélépipédique, d'une longueur de 40 μm pour une largeur de 25 μm en moyenne. Selon ces deux axes, on peut constater la présence d'ondulations sur la longueur des parois cellulaires selon l'axe tangentiel. L'axe radial se distingue des deux autres par la forme hexagonale des cellules, avec une structure cellulaire, dite en nid d'abeille. Il convient de noter que la géométrie cellulaire n'est pas constituée uniquement d'hexagones parfaits, mais présente également des pentagones plus ou moins déformés [6]. En outre, la taille et la forme de ces cellules sont par ailleurs très bien décrites dans

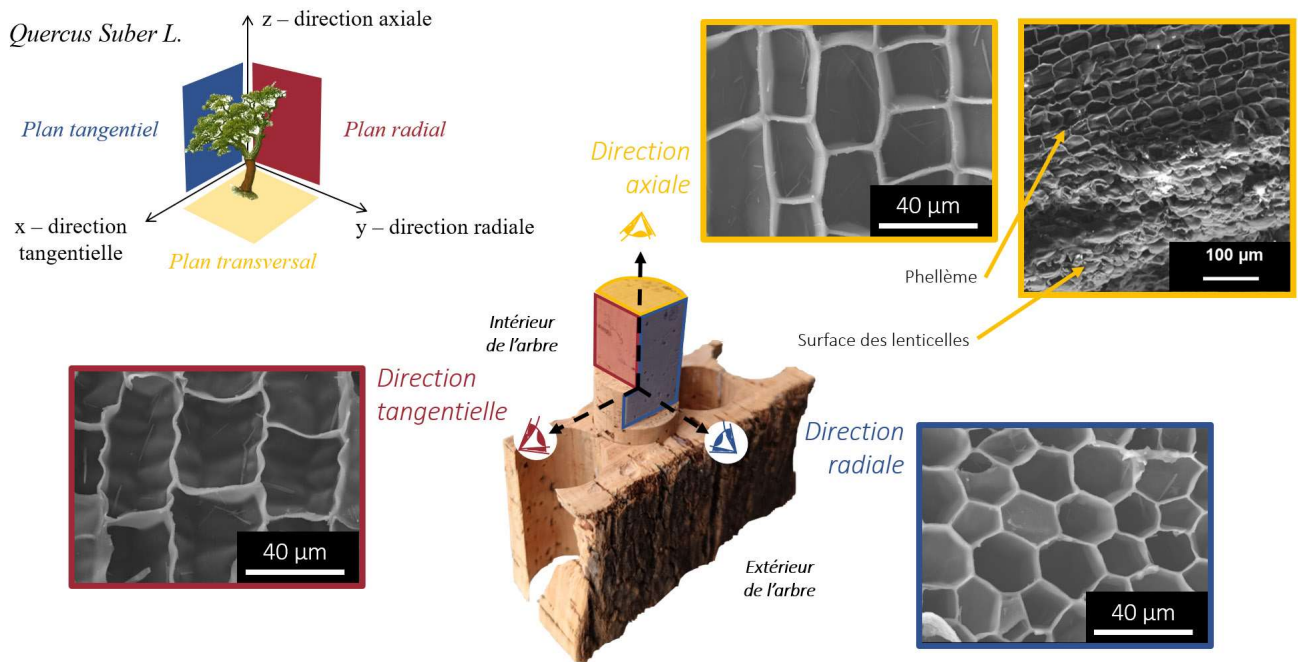


Figure 2 : Représentation des trois axes du liège avec les observations par microscope électronique à balayage des plans cellulaires associés : axial ; radial ; tangential (adaptée de Gerometta et al., [25]).

la littérature [7, 2, 8, 9] et cette structure cellulaire orientée selon 3 plans demeurent très proches de celle du bois [10].

Même si la microscopie électronique à balayage permet d'observer la forme et la taille des cellules de liège, la différenciation avec les lenticelles n'est pas accessible en utilisant cette technique. La microscopie biphotonique, basée sur l'autofluorescence des composés, est couramment utilisée pour observer des cellules végétales ou animales. En effet, les parois des cellules de liège sont composées de lignine et de subérine, qui sont deux fluorophores naturels. Ces composés fluorescent sur une gamme d'émission de 440 à 540 nm et de 460 à 500 nm, respectivement [11, 3], et confèrent donc au liège une autofluorescence naturelle qui peut être facilement observée par microscopie biphotonique. Cette méthode d'imagerie a ainsi permis non seulement d'obtenir des images 2D des cellules de liège, mais aussi une représentation 3D de cette structure à l'échelle cellulaire sur quelques dizaines de micromètres (**Figure 3**).

L'utilisation de cette technique a permis une avancée majeure dans la compréhension de la structure cellulaire de ce matériau, en différenciant clairement les cellules du phellème des cellules présentes au niveau des lenticelles. Ainsi, les cellules situées à la frontière entre le phellème et les

lenticelles présentent des parois dix fois plus épaisses, d'environ 10 μm , contre 1 μm pour la paroi des cellules du phellème. Par ailleurs, cette différenciation cellulaire ne s'effectue que sur une unique couche de cellules, comme le montre la **Figure 3**. La forme et la composition chimique des cellules composant les lenticelles sont également très différentes de celles du phellème.

Elles ne présentent plus une forme bien définie, parallélépipédique ou hexagonale selon les directions, mais semblent plus s'apparenter à des sphères ou à des ellipses. Par ailleurs, la différence de fluorescence observée, entre le phellème et les lenticelles, indique qu'une variation de composition chimique en serait à l'origine. Dans l'étude de Crouvisier-Urien *et al.* [12], l'imagerie a été couplée à une analyse de la composition chimique de la paroi cellulaire par XPS (Spectrométrie Photoélectronique X). Les résultats ont révélé une différence significative entre le phellème et les lenticelles. Les parois cellulaires bordant les lenticelles présentaient une teneur en carbone plus élevée (rapport C/O de $4,28 \pm 0,16$) par rapport à celles du phellème (rapport C/O de $3,79 \pm 0,09$) indiquant un changement de composition chimique dû à la différenciation des cellules.

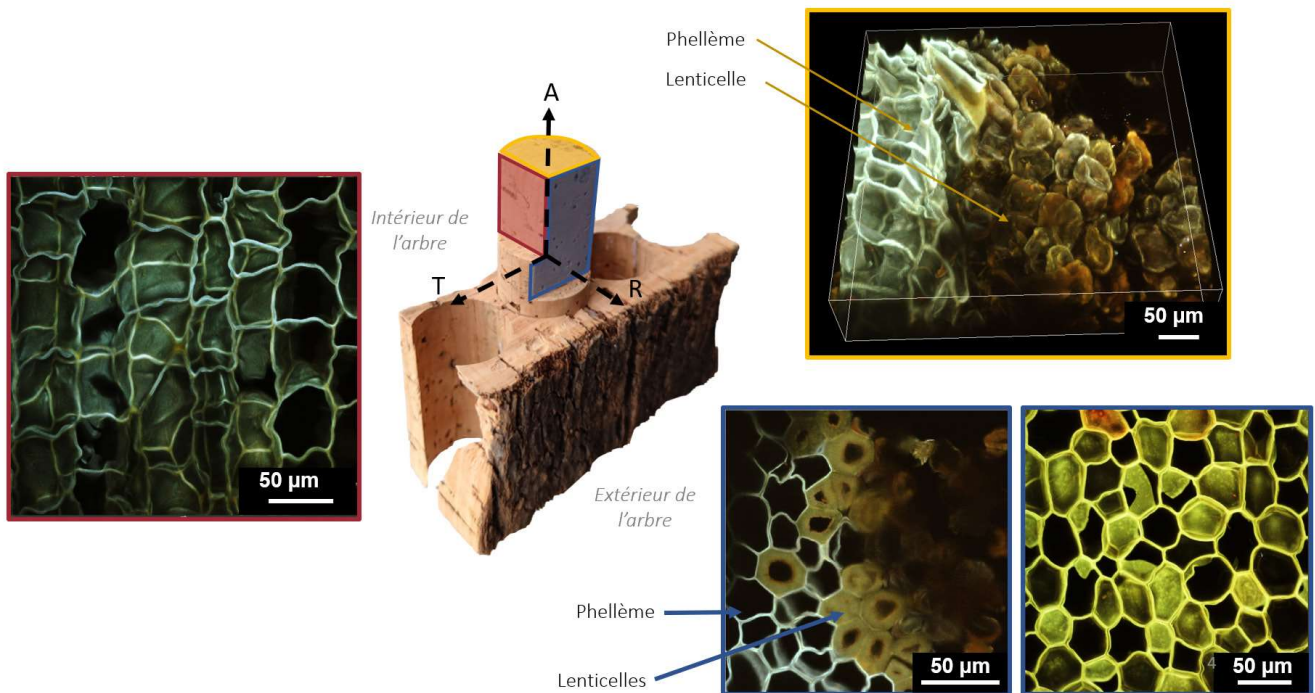


Figure 3 : Structure cellulaire du liège observée par microscopie biphotonique selon les directions axiale (A), radiale (R) et tangentielle (T) (adaptée de Crouvisier-Urien *et al.*, [12]).

3.3. Exploration des parois cellulaires à l'échelle nanométrique

La **Figure 4** montre une observation de la paroi cellulaire du liège par microscopie électronique à transmission (MET). En accord avec les données de la littérature [13, 14], quatre couches sont observées au sein de cette paroi cellulaire : la lamelle moyenne (ML), la paroi primaire (P1), la paroi secondaire (P2) et la paroi tertiaire (P3). La paroi primaire, très fine, apparaît à la périphérie de la lamelle centrale et demeure difficile à distinguer. Par ailleurs, la différence de contraste observée sur les images de MET met en évidence une différence de composition chimique entre ces couches constitutives. En outre, le cliché MET sélectionné met en évidence un plasmodesme traversant une paroi cellulaire. En ce qui concerne la forme et la structure de ces plasmodesmes, ils sont généralement non ramifiés, avec un diamètre d'environ 50 ± 10 nm, et ne sont pas toujours uniformément répartis le long de la paroi cellulaire du liège.

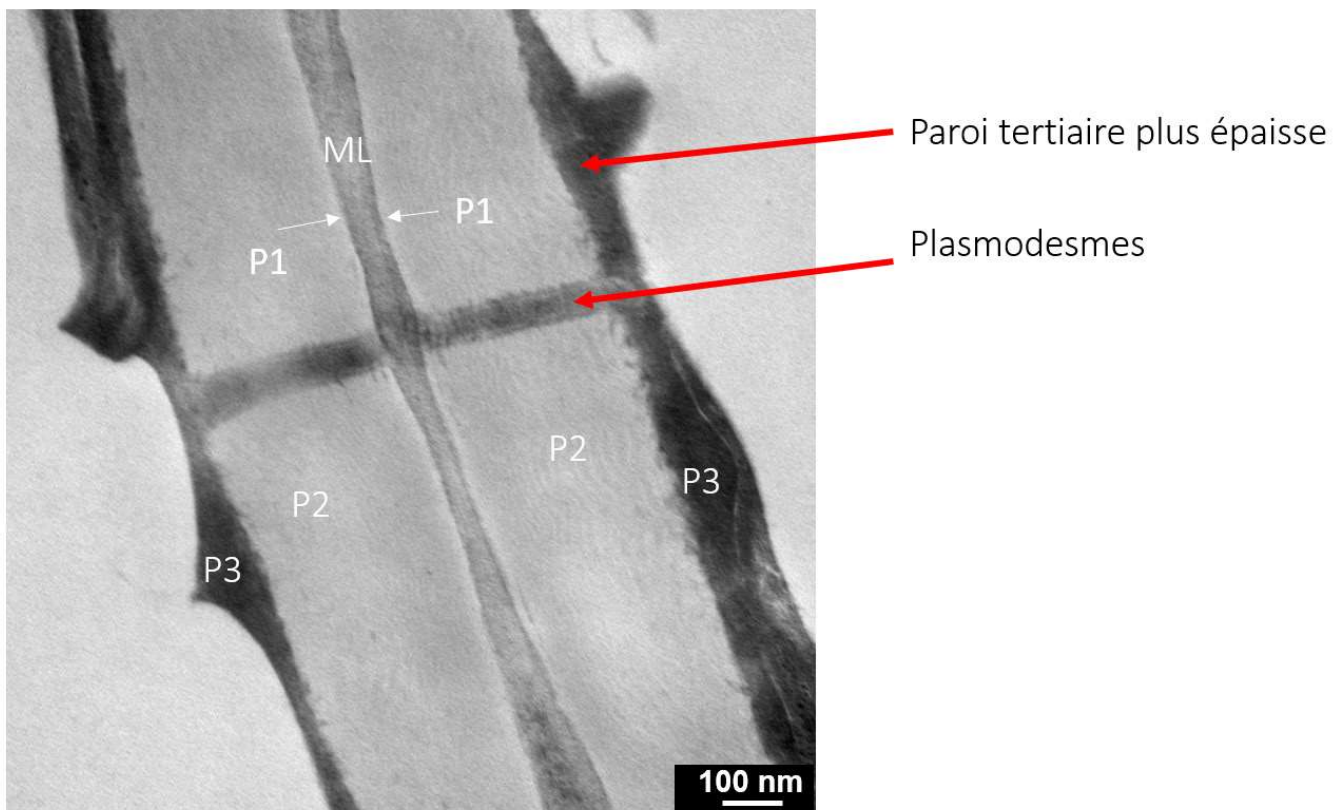


Figure 4 : Paroi cellulaire observée par microscopie électronique à transmission (MET): lamelle moyenne (ML), paroi primaire (P1), paroi secondaire (P2) et paroi tertiaire (P3). L'image MET sélectionnée met en évidence un plasmodesme traversant la paroi cellulaire.

4. DISCUSSION

Le liège est un matériau naturel, anisotrope, très hétérogène, dont l'exploration de la structure permet de contribuer à une meilleure compréhension de la relation structure / fonction de ce matériau. L'étude de la structure interne du liège par tomographie à rayons X a montré que la quantité de lenticelles était plus importante dans le liège de moindre qualité. La méthode de tri actuellement utilisée sur ligne de production demeure donc appropriée. Toutefois, les valeurs de macroporosité calculées pourraient être améliorées grâce à l'automatisation du traitement d'images. Les niveaux de seuillages appliqués dans cette étude étant arbitraires, on estime à 10 % l'erreur qui peut être faite sur le calcul des volumes macroporeux.

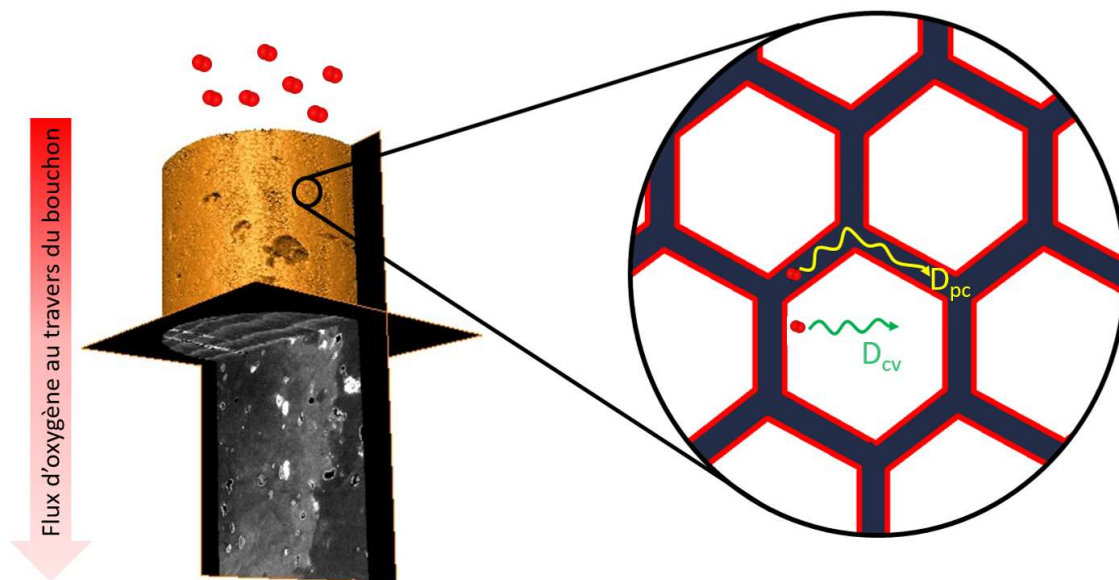
La tomographie à rayons X a également permis d'avoir accès à la répartition des lenticelles qui en constituent la macroporosité. Comme discuté dans la section 3.1, les lenticelles ne sont pas interconnectées, ce qui signifie qu'il n'y a pas de chemin préférentiel pour les gaz, comme l'oxygène, au sein d'un bouchon en liège de qualité grade 0 ou grade 4. Ce premier résultat est capital lorsque l'on s'intéresse à la diffusion des gaz au sein de ce matériau. En effet, lors de la conservation des vins en bouteilles, l'oxygène présent dans l'atmosphère va diffuser au travers du système d'obturation (constitué du goulot et du bouchon), et entraîner par la suite des réactions d'oxydation dans le vin. Ce transfert d'oxygène peut s'effectuer le long de l'interface entre le goulot en verre de la bouteille et le bouchon, mais également au travers du matériau, et donc des parois cellulaires le constituant [15-19]. Cette absence d'interconnectivité entre les lenticelles indique de ce fait, qu'au cours de la diffusion de l'oxygène, ces molécules devront obligatoirement traverser cette phase dense, constituée des parois cellulaires, qui constitue ainsi l'étape limitante au transfert de matière [20-24]. A ce jour, aucune étude expérimentale n'a permis de mettre en évidence le rôle des lenticelles dans ces phénomènes de diffusion. L'utilisation d'outils de modélisation permettraient d'appréhender leur contribution et ainsi de mieux comprendre les entrées d'oxygène dans une bouteille.

Enfin, à l'échelle nanoscopique, une matière dense au sein des plasmodesmes a été observée. Dans les cellules végétales vivantes, ces canaux ont pour objectif d'assurer la circulation des métabolites entre les cytoplasmes des cellules voisines. Les cellules de liège étant mortes, la présence de cette phase dense est liée la subérisation rapide des parois qui est suivie de l'obstruction des plasmodesmes. Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de ces plasmodesmes, la tomographie électronique pourrait être utilisée. En effet, cette technique permettrait d'avoir accès à la structure d'un plasmodesme en trois dimensions, et d'évaluer ainsi sa structure pour compléter les modèles mathématiques de diffusion.

5. CONCLUSION

Pour conclure, ce travail a permis d'effectuer une analyse multi-échelle de la structure du liège en couplant différentes techniques d'imagerie. La tomographie à rayons X, bien adaptée à l'analyse de la macroporosité du bouchon de liège, a permis de déterminer la fraction volumique des lenticelles à l'intérieur du matériau. La qualité du liège, déterminée à partir de la quantité de lenticelles en surface, est assez représentative de la porosité interne du liège pour les échantillons sélectionnés dans cette étude. En outre, la tomographie à rayons X a également montré une absence d'interconnectivité des lenticelles qui constitue un point capital pour comprendre les mécanismes de transfert de matière au travers de ce matériau naturel.

La caractérisation des cellules du phellème a été réalisée par microscopie électronique et biphotonique. Ces deux techniques ont permis de révéler des différences de structure entre les cellules composant le phellème et les lenticelles, la différenciation cellulaire s'opérant sur une unique couche de cellules avec une paroi cellulaire dix fois plus épaisse. À l'échelle nanométrique, les plasmodesmes ont été étudiés et une phase dense au sein de ces canaux a été identifiée. Cette approche d'imagerie multi-échelle a ainsi permis de mieux comprendre la structure du liège qui est essentielle pour appréhender les relations structure / propriétés de ce matériau naturel (**Figure 5**).



● : molécule de dioxygène ■ : paroi cellulaire ◻ : cellule de liège
 D_{cv} : coefficient de diffusion dans les cellules vides D_{pc} : coefficient de diffusion au travers des parois cellulaires

Figure 5 : Représentation schématique des phénomènes de diffusion de l'oxygène dans les cellules de liège.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la plateforme DImaCell Imaging Facility (UMR PAM, INRAE, L'Institut Agro, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté) pour l'accès aux équipements de microscopie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. HOOKE R. Micrographia. The Royal Society, 1664.
2. GIBSON L.J., EASTERLING K.E. & ASHBY M.F. The structure and mechanics of cork. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences*, 1981, **377** (1769): 99-117 <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspa.1981.0117>

3. ROST B.F.W.D. Fluorescence microscopy, volume II By F.W.D. Rost Cambridge University Press, Cambridge and New York (1995) ISBN 0-521-41088-6; 457 pages; \$175.00. *Scanning*, 1996, **18** (8): 593-593 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sca.4950180810>
4. LAGORCE-TACHON A., et al. The cork viewed from the inside. *Journal of Food Engineering*, 2015, **149** 214-221 <Go to ISI>://WOS:000347361700026
5. OLIVEIRA V., et al. Cork structural discontinuities studied with X-ray microtomography. *Holzforschung*, 2016, **70** (1): 87-94 <https://doi.org/10.1515/hf-2014-0245>
6. LAGORCE-TACHON A., et al. Contribution of image processing for analyzing the cellular structure of cork. *Journal of Chemometrics*, 2018, **32** (1):
7. GIBSON L.J. Biomechanics of cellular solids. *Journal of Biomechanics*, 2005, **38** (3): 377-399 <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T82-4F3NXTB-1/2/5d9425f29019a77831ad9db70de0d564>
8. GIL L. Cork Composites: A Review. *Materials*, 2009, **2** (3): 776-789 <https://www.mdpi.com/1996-1944/2/3/776>
9. PEREIRA H. Chapter 2 - The structure of cork, in *Cork*, edited by H. Pereira: Elsevier Science B.V., 2007: 33-53. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444529671500042>
10. SHI J., et al. Visualization of wood cell structure during cellulose purification via high resolution X-ray CT and spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 2022, **189** 115869 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669022013528>
11. BERG R.H. & BEACHY R.N. Fluorescent protein applications in plants. *Methods Cell Biol*, 2008, **85** 153-177
12. CROUVISIER-URION K., et al. Four hundred years of cork imaging: New advances in the characterization of the cork structure. *Scientific Reports*, 2019, **9** (1): 19682 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55193-9>
13. PEREIRA H. *Cork: biology, production and uses*. Elsevier Science, 2007. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B87G0-4PT2S80-J/2/0856d2bd9e104d2a4bce879640bf1eb5>
14. SONG X. & ZHAO J. Ultrastructural study of plasmodesmata in cork cells from *Quercus variabilis* Blume (Fagaceae). *Industrial Crops and Products*, 2017, **97** 275-280

15. CHANUT J., *et al.* Controlled diffusion by thin layer coating: The intricate case of the glass-stopper interface. *Food Control*, 2021, **120** 107446 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713520303625>
16. CHANUT J., *et al.* Fast manometric method for determining the effective oxygen diffusion coefficient through wine stopper. *Polymer Testing*, 2021, **93** 106924 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014294182032153X>
17. LAGORCE-TACHON A., *et al.* About the Role of the Bottleneck/Cork Interface on Oxygen Transfer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64** (35): 6672–6675 <Go to ISI>://WOS:000382902000002
18. LAGORCE-TACHON A., *et al.* Diffusion of Oxygen through Cork Stopper: Is It a Knudsen or a Fickian Mechanism? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, **62** (37): 9180–9185 <Go to ISI>://WOS:000342119200016
19. LEQUIN S., *et al.* Diffusion of oxygen in cork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60** (13): 3348–3356 <Go to ISI>://WOS:000302336500003
20. GROH B., HÜBNER C. & LENDZIAN K. Water and oxygen permeance of phellem isolated from trees: the role of waxes and lenticels. *Planta*, 2002, **215** (5): 794–801 <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-002-0811-8>
21. LOPES P., SAUCIER C. & GLORIES Y. Nondestructive colorimetric method to determine the oxygen diffusion rate through closures used in wine making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53** 6967–6973
22. OLIVEIRA V., *et al.* Kinetics of Oxygen Ingress into Wine Bottles Closed with Natural Cork Stoppers of Different Qualities. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2013, **64** (3): 395–399 <Go to ISI>://WOS:000338924200012
23. SILVA A., LAMBRI M. & DE FAVERI M.D. Evaluation of the performances of synthetic and cork stoppers up to 24 months post-bottling *European Food Research and Technology*, 2003, **216** 529–534
24. WATERS E., *et al.* The inherent permeability of corks to oxygen. *Australian Wine Research Institute Annual Report*, 2001, **31**
25. GEROMETTA M., *et al.* Towards better understanding of the strain–stress curve of cork: A structure–mechanical properties approach. *Materials & Design*, 2023, **235** 112376 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264127523007918>